动 物 学 研 究 1997，18（3）：333—339 CN 53-1040／Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

云南文山黄牛和迪庆黄牛遗传多样性的蛋白电泳研究*

俞 英 文际坤[①] 朱芳贤[①] 赵开典[①] 宿 兵[②]
王 文[②] 张亚平[②] 刘爱华[②] 季维智[②] 施立明[②]
（① 云南省肉牛和牧草研究实验中心 昆明 650212）
（② 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室 昆明 650223）

摘要 采用水平淀粉胶蛋白电泳技术分析了云南文山黄牛和迪庆黄牛的 33 种血液蛋白及同工酶，共计 37 个遗传座位，其中 6 个座位检测到多态性。文山黄牛的多态座位百分比 $P=0.1389$，平均杂合度 $H=0.0610$，迪庆黄牛 $P=0.1667$，$H=0.0691$。通过 Nei 氏遗传距离计算，运用 PHYLIP 3.5C 软件包中的“UPGMA”，“CONTML”和“NEIGHBOR”法，结合前人报道的数据对 10 个黄牛品种进行聚类分析。结果得出：文山黄牛可能主要起源于瘤牛(*Bos indicus*)，迪庆黄牛可能主要起源于普通黄牛(*Bos taurus*)。我们的结果提示，云南黄牛可能是由当地人驯化的野生牛群与外来的驯化牛群相结合并适应当地气候和环境逐渐形成的，因而在蛋白水平上具有较为丰富的多样性。

关键词 云南黄牛，蛋白电泳，平均杂合度，遗传距离

中国是世界上黄牛品种较多，基因库较为丰富的国家之一。众多研究均认为中国现代黄牛来自多源，其起源主要是：普通黄牛(*Bos taurus*)、瘤牛(*Bos indicus*)和爪哇牛(*Bos banteng*) (陈幼春等，1990)。云南省黄牛资源极为丰富，其中文山黄牛和迪庆黄牛就是两个比较优良的地方品种，分别代表云南黄牛的华南类型和高原类型，是研究云南牛种起源、演化和分类不可缺少的材料(黄启昆，1984)。

生物多样性的研究和保护是目前世界普遍关注的问题。随着生化技术的发展，血液蛋白及同工酶多态分析被广泛应用于生物遗传多样性研究。本研究旨在采用水平淀粉胶蛋白电泳技术测定文山黄牛和迪庆黄牛的血液蛋白及同工酶多态性，为分析云南两个地方黄牛品种的遗传背景、遗传分化关系以及同畜牧业直接相关的保种和杂交改良利用提供有用的遗传学基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

文山黄牛 29 个血液样品(18♂♂，11♀♀)，采自云南文山县和西畴县；迪庆黄牛 36

* 云南省应用基础研究重大项目基金资助
本文 1996 年 5 月 8 日收到，同年 8 月 28 日修回

个血液样品(23♂♂，13♀♀)采自德钦县和中甸县。每头牛颈静脉采血8—10 ml，肝素抗凝。室温下以1000 r／min离心10 min，吸取上层的血浆部分。下层血细胞以5倍体积生理盐水漂洗后再于1000 r／min离心10 min，弃上清液。重新漂洗1次。吸取下层红细胞。处理得到的血浆和红细胞样品冻存于液氮罐中。

1.2 试剂

马铃薯淀粉购自浙江湖州食品化工联合公司，通过酸水解制成水解淀粉。组织化学染色试剂购自华美生物工程公司及美国SIGMA公司。

1.3 电泳分析

采用水平淀粉胶蛋白电泳技术：淀粉胶浓度12%，电泳缓冲系统及参数如下：Ⅰ Tris-Citrate(pH7.0)；Ⅱ Tris-Borate-EDTA(pH8.6)；Ⅲ Tris-Borate-EDTA(pH8.0)；Ⅳ Borate-NaOH(pH7.8)；Ⅴ Borate-NaOH(pH8.5)；Ⅵ LiOH-Borate(pH8.0)；Ⅶ Tris-Glycine(pH8.3)；ⅧTris-Citrate(pH5.6)。组织化学染色方法参见前人的报道(Pasture等，1990)。等位基因的命名按照前人推荐的方法：HB、TF、ALB分别按Bangham等(1957)、Ashton等(1965)的命名法判型；CAR按Sartore等(1969)的命名法判型；NP、6PGD是根据电泳移动速度把快带定为A，慢带定为B。

1.4 数据处理

包括基因频率(*qi*)、座位杂合度(*h*)、平均杂合度(*H*)、Nei氏遗传距离(*D*)的数值计算(Nei等，1973；根井正利等，1983)。

1.5 聚类分析

采用PHYLIP 3.5C软件包中的“UPGMA”、“CONTML”和“NEIGHBOR”3种方法进行聚类(Saiton等，1987；Sneath等，1973)。

2 结果和讨论

2.1 群体遗传多样性

本文分析了文山黄牛和迪庆黄牛血浆及红细胞中的33种血液蛋白及同工酶，共计37个遗传座位，其中28个座位存在于红细胞中。文山黄牛的FUM座位和迪庆黄牛的GOT座位未显带，可能与组织特异性或酶活性低有关。两种牛的ALB、CAR、HB-β、NP、TF 5个座位以及迪庆黄牛的6PGD座位具有多态性(表1)。

近年来，我国研究者对国内20个主要黄牛品种进行了部分遗传学研究，对中国黄牛的起源、演化和分类有了较深入的认识(陈幼春等，1990)。但这些研究工作多限于血浆中血液蛋白及同工酶的分析，红细胞中大量的同工酶研究尚少有报道。通过我们的研究发现，在云南文山黄牛和迪庆黄牛红细胞里检测到的28个遗传座位中，有3个表现出多态，分别是CAR、NP及6PGD座位，其中6PGD座位仅在迪庆黄牛中表现出多态。3种酶各由1对等位基因控制。文山黄牛和迪庆黄牛CAR^F，NP^A，$6PGD^A$基因频率分别为0.5891，0.6714；0.7321，0.8889；–，0.6389；CAR^S，NP^B，$6PGD^B$基因频率分别为0.4109，0.3286；0.2679，0.1111；–，0.3611。Gorman等(1979)的研究表明，对于群体的平均杂合度和遗传距离的计算，所检测的座位数目比样本数目更为重要。座位数目越多(>30)，其结果的可靠性越高。本研究分析了云南文山黄牛和迪庆黄牛33种血液蛋白及同工酶，共计37个座位的多态性，基本真实地反映了两个地方黄牛的群体遗传多样性。

表1　云南文山黄牛和迪庆黄牛蛋白多态性分析结果

Tab.1　Analytical results of Wenshan and Diqing yellow cattle's proteins electrophyoretically

组织	座位	名称	标准名称	缓冲系统	座位杂合度	
					文山黄牛	迪庆黄牛
血浆蛋白座位	1. ALP	碱性磷酯酶	EC3.1.3.1	Ⅵ	0	0
	2. ALB	白蛋白	—	Ⅷ	0.3220	0.4132
	3. AMY-1	淀粉酶	EC3.2.1.1	Ⅶ	0	0
	4. CP	铜蓝蛋白	—	Ⅵ	0	0
	5. ES-3	血浆酯酶	EC3.1.1.1	Ⅵ	0	0
	6. LAP	亮氨酰氨基肽酶	EC3.4.11.1	Ⅵ	0	0
	7. PO	后白蛋白	—	Ⅳ	0	0
	8. TF	转铁蛋白	—	Ⅳ	0.4155	0.6663
	9. Sα2	α-巨球蛋白	—	Ⅳ	0	0
红细胞蛋白座位	10. Hb-α	血红蛋白α	—	Ⅴ	0	0
	11. Hb-β	血红蛋白β	—	Ⅴ	0.6046	0.3070
	12. Ak	腺苷激酶	EC2.7.4.3	Ⅰ	0	0
	13. ALD	醛缩酶	EC4.1.2.13	Ⅰ	0	0
	14. ADA	腺苷脱氢酶	—	Ⅰ	0	0
	15. CAR	碳酸脱水酶	EC4.2.1.1	Ⅱ	0.4841	0.4412
	16. CAT	过氧化氢酶	EC1.11.1.6	Ⅱ	0	0
	17. ES-1	酯酶-D	EC3.1.1.1	Ⅰ	0	0
	18. ES-2	红细胞脂酶	EC3.1.1.1	Ⅰ	0	0
	19. FUM	延胡索酸酶	EC4.2.1.2	Ⅱ	—	0
	20. GO-1	乙二醛酶-1	EC4.4.1.5	Ⅱ	0	0
	21. GOT	谷草转氨酶	EC2.6.1.1	Ⅰ	0	—
	22. G6PD	葡糖6磷酸脱氢酶	EC1.1.1.49	Ⅲ	0	0
	23. 6PGD	6-磷酸葡糖酸脱氢酶	EC1.1.1.43	Ⅰ	0	0.4614
	24. GAPD	磷酸甘油醛脱氢酶	EC1.2.1.12	Ⅲ	0	0
	25. HK	己糖激酶	EC2.7.1.1	Ⅰ	0	0
	26. HBDH	β-羟丁酸脱氢酶	—	Ⅰ	0	0
	27. IDH	异柠檬酸脱氢酶	EC1.1.1.42	Ⅰ	0	0
	28. LDH-1	乳酸脱氢酶-1	EC1.1.1.27	Ⅰ	0	0
	29. LDH-2	乳酸脱氢酶-2	EC1.1.1.27	Ⅰ	0	0
	30. ME	苹果酸酶	EC1.1.1.40	Ⅰ	0	0
	31. MDH	苹果酸脱氢酶	EC1.1.1.37	Ⅰ	0	0
	32. NP	核苷磷酸化酶	EC2.4.7.1	Ⅲ	0.3923	0.1975
	33. PGM	磷酸葡糖变位酶	EC2.7.5.1	Ⅰ	0	0
	34. PK	丙酮酸激酶	—	Ⅲ	0	0
	35. XDH	黄嘌呤脱氢酶	EC1.2.1.37	Ⅲ	0	0
	36. SDH	山梨醇脱氢酶	—	Ⅲ	0	0
	37. TO	超氧化物歧化酶	EC1.15.1.1	Ⅰ	0	0
多态位点百分比(P)					0.1389	0.1667
平均杂合度(H)					0.0610	0.0691

多态座位百分比(P)和平均杂合度(H)通常是衡量群体遗传多样性丰富程度的两个指标。蛋白多态性的研究显示，P，H 在哺乳动物中有一定水平的种内变异，平均为 $P=0.2220$，$H=0.050$(Nevo 等，1984)。聂龙等(1995)研究云南贡山独龙牛血液蛋白 44 个遗传座位得出 $P=0.0680$，$H=0.0260$，结果认为独龙牛历史上可能受过瓶颈效应事件的的影响，从而造成遗传多样性贫乏。本研究中文山黄牛 $P=0.1389$，$H=0.0610$，迪庆黄牛 $P=0.1667$，$H=0.0691$。相比之下，云南这两个地方牛种的蛋白多态程度与一般哺乳动物的平均值相当，并明显高于独龙牛。

2.2 聚类分析

众多研究表明 ALB、HB、TF 3 个座位在家牛中普遍具有多态性，分别受 4、3、8 共 15 个等位基因控制(Ashton 等，1959，1965；Bangham 等，1957)。ALB^A 是普通黄牛的代表基因，频率为 1.0000；ALB^B 是巴厘牛(爪哇牛的家养种)和瘤牛的代表基因，在巴厘牛中最高，为 0.9870。该基因可能与耐热性有关，频率从欧州到非洲逐渐增高，频率越高耐热性也越高(Takao 等，1978；Khanna 等，1972)。TF^F 基因频率在我国南方黄牛中普遍较高，其中海南黄牛最高，为 0.8480，而瘤牛中最高的仅为 0.5000(王毓英等，1990)。由于 TF^F 基因频率在中国牛品种中最高，曹红鹤等(1990)根据基因的流向分析认为，中国南方可能是牛属动物的发源地所在。HB^A、HB^B、HB^C 可以代表 3 种典型家牛的类型，即 3 个基因在普通黄牛、瘤牛和巴厘牛中以各自特有的频率存在，HB^A 以普通黄牛最高，一般为 0.9000—1.0000。HB^B 在瘤牛中最高，为 0.4500。HB^C 在巴厘牛中最高，为 0.8065 (Bangham 等，1957)。

表 2 10 个黄牛品种 3 个位点的基因频率

Tab. 2 Gene frequencies from 3 loci of 10 yellow cattle breeds

品种	基因频率														
	ALB^A	ALB^B	ALB^C	ALB^D	HB^A	HB^B	HB^C	TF^A	TF^B	TF^{D1}	TF^{D2}	TF^E	TF^F	TF^{A1}	TF^G
延边黄牛	0.9590	0.0240	0.0120	0.0040	0.9230	0.0770	0.0000	0.2280	0.0000	0.3370	0.1790	0.2560	0.0000	0.0000	0.0000
秦川黄牛	0.4430	0.5430	0.0140	0.0000	0.8250	0.0840	0.0910	0.1540	0.0000	0.2410	0.1930	0.1350	0.2780	0.0000	0.0000
温岭黄牛	0.2430	0.7380	0.0200	0.0000	0.7070	0.0510	0.2420	0.1340	0.0150	0.0000	0.0150	0.1040	0.7330	0.0000	0.0000
海南黄牛	0.0590	0.8920	0.0290	0.0200	0.6960	0.0450	0.2590	0.0340	0.0000	0.0150	0.0150	0.0880	0.8480	0.0000	0.0000
黑白花奶牛	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.4140	0.0000	0.2120	0.3640	0.0110	0.0000	0.0000	0.0000
菲律宾牛	0.2100	0.7720	0.0170	0.0000	0.5870	0.2530	0.1600	0.0940	0.0000	0.0310	0.7310	0.1620	0.0000	0.0000	0.0000
巴厘牛	0.0130	0.9870	0.0000	0.0000	0.0940	0.1140	0.7910	0.0040	0.0000	0.7390	0.2120	0.0440	0.0000	0.0000	0.0000
辛地红牛	0.0140	0.8680	0.1130	0.0050	0.5570	0.4430	0.0000	0.1560	0.0160	0.0000	0.0100	0.3820	0.4350	0.0050	0.0050
文山黄牛	0.1786	0.8036	0.0178	0.0000	0.5345	0.2068	0.2586	0.1034	0.0000	0.1552	0.0000	0.0000	0.7414	0.0000	0.0000
迪庆黄牛	0.7083	0.2917	0.0000	0.0000	0.8198	0.1386	0.0417	0.3194	0.0000	0.3333	0.0000	0.0000	0.3473	0.0000	0.0000

我们根据上述 3 个座位各等位基因的基因频率，计算出文山黄牛、迪庆黄牛以及前人报道的延边黄牛、秦川黄牛、温岭黄牛、海南黄牛、黑白花奶牛、菲律宾牛、辛地红牛、巴厘牛之间的标准遗传距离(表 2、表 3) (Harpeet 等，1980；曹红鹤等，1990)。然后采用 PHYLIP 3.5C 软件包中的“UPGMA”、“CONTML”和“NEIGHBOR”法进行聚类分析，结果得出：3 种方法所获系统树均支持迪庆黄牛、秦川黄牛、延边黄牛和荷兰牛(黑

白花奶牛)聚为一支，文山黄牛、海南黄牛、温岭黄牛和辛地红牛聚为另一支(图1)。前一支均含有较高的 ALB^A 和 HB^A 基因频率，具有典型的普通黄牛特征，说明迪庆黄牛可能主要起源于普通黄牛。后一支则含有较高的 HB^B 基因频率，是典型的瘤牛特征。此外，该支还有相对较高的代表爪哇牛特征的 ALB^B、HB^C 基因频率，说明文山黄牛可能主要起源于瘤牛，并与爪哇牛有一定血缘关系。文山黄牛较高的 TF^F 频率(0.7414)为曹红鹤等(1990)的结论提供了新的佐证。

表3　10个黄牛品种的Nei氏遗传距离

Tab. 3　Nei's genetic distance between ten cattle breeds

品　种	遗传距离									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
延边黄牛	0.0000									
秦川黄牛	0.1954	0.0000								
温岭黄牛	0.6646	0.1362	0.0000							
海南黄牛	0.9950	0.2195	0.0176	0.0000						
黑白花奶牛	0.0344	0.2211	0.6895	1.0439	0.0000					
菲律宾牛	0.6202	0.2210	0.4028	0.4402	0.5712	0.0000				
巴厘牛	1.5964	0.6430	0.6686	0.6032	1.8947	0.4975	0.0000			
辛地红牛	0.9319	0.2534	0.1533	0.1456	1.1131	0.3135	0.6637	0.0000		
文山黄牛	0.8633	0.1929	0.0295	0.0258	0.9170	0.4245	0.4773	0.1402	0.0000	
迪庆黄牛	0.1021	0.0788	0.2657	0.4237	0.1175	0.5529	1.0365	0.5025	0.3258	0.0000

据历史文献记载，中国养牛史始于纪元前8000年前后的伏羲氏时代(邱怀等，1988)。古生物学家论证了青藏高原可能是我国家牛最早发源地之一。陈幼春等(1990)认为，黄河中下游流域是原牛(*Bos primigenius*)的亚洲变种和瘤原牛(*Bos namadicus*)的早期驯化中心之一，随着历代中原人民的迁移，黄牛分布范围逐渐扩展，广泛普及于南北各地。另据报道，在云南省内先后多处挖掘到牛类化石，最早的距今已有170余万年，说明云南早已有土生土长的牛(许文博等，1994)。云南有许多出土文物(铜器等)反映了原始家养瘤牛的形象。两汉至五代有大量记载着关于"犦牛"、"犎牛"等瘤牛别称的文献，清晰地反映出云南有一条驯化瘤原牛的线索。李本《百夷传》中记载的"牛有水牛身而黄牛头者"描述了云南过去可能分布有爪哇牛。据在文山州邱北县挖掘出更新世晚期的牛类化石可知，文山州很早就有牛分布，州内70%的地区属于亚热带气候，因而当地牛的瘤牛特征较为显著，与爪哇牛可能通过

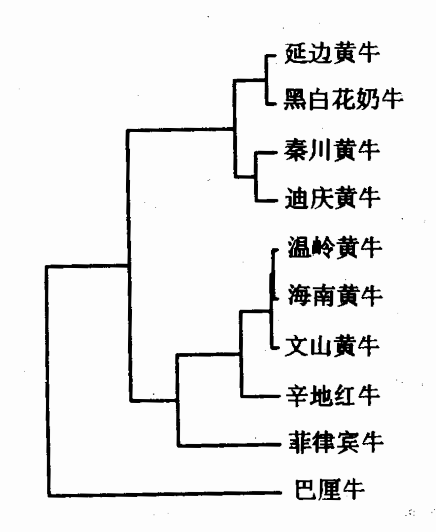


图1　UPGMA聚类关系图

Fig. 1　UPGMA dendrogram

可育的杂种母牛进行基因交流。迪庆州地处青藏高原的南延部分，气候寒冷，长冬无夏。迪庆黄牛长期生活在高寒山区，具有较多的普通黄牛的特征，很可能与西藏黄牛同源，即起源于青藏高原(马汉儒等，1988)。我们据同工酶研究结果进行聚类分析认为：云南迪庆黄牛和文山黄牛的起源与上述史载相符。由此看来，云南黄牛可能是由当地人驯化的野生牛群与外来的驯化牛群相结合，并适应当地的气候环境逐渐形成的。其起源至少受普通黄牛、瘤牛和爪哇牛的多重影响。

致谢 本文承蒙朱熙梅、刘建勇、格茸都吉、梁正宏、郭光凤等同志在野外采样工作中的帮助与支持，刘爱华教授、林世英老师、苟世康老师、兰宏博士、聂龙、朱春玲等同志给予的实验技术指导和帮助，特此致谢。

参 考 文 献

马汉儒，1988. 云南地州市县概况——文山州分册、迪庆州分册. 1—15.

王铖英，曹红鹤，庞之洪等，1990. 中国黄牛血清转铁蛋白多态性的研究，中国黄牛生态种特征及其利用方向，北京：农业出版社，60—71.

许文博，朱 静，刘舜才等，1994. 云南黄牛品种分类的研究. 云南农业大学学报，1：28—33.

陈幼春，王铖英，曹红鹤等，1990. 中国黄牛生态特征及其利用方向，北京：农业出版社，50—65.

邱 怀，1988. 中国牛品种志. 上海：上海科技出版社. 213—215.

根井正利，1983. 分子群体遗传学与进化论. 王家玉译，北京：农业出版社. 122—125.

聂 龙，施立明，和向东等，1995. 独龙牛遗传多样性及其种群遗传结构的等位酶分析，遗传学报，**22**(3)：185—191.

黄启昆，王玉嵩，王守信等，1987. 云南省家畜家禽品种志. 昆明：云南科技出版社，50—65.

曹红鹤，王铖英，张 跃等，1990. 利用三种血液蛋白的多态性探讨中国黄牛品种与世界牛种的亲缘关系，中国黄牛生态种特征及其利用方向. 北京：农业出版社，42—54.

Ashton G C, 1965. Serum albumin and transferrin polymorphism in east African cattle. Lampkin, *Nature*, **205**: 209-210.

Bangham A D, 1957. Distrbution of electrophoretically different hemoglobins among cattle breets of creat Britain. *Nature*, **179**: 467-468.

Gorman G C, Renzi J, 1979. Genetic distance and heterozygosity estimates in electrophoretic studies: effects of sumple size, *Copeia*, **2**: 242-249.

Harpeet S, *et al*, 1980. Genetic studies on serum transferrin polymorphism in the blood of Indian cattle. *Anim. Sci.*, **50**(4): 297-310.

Khanna N D, Harpreet Singh, 1972. Serum albumin polymorphism in four Indian cattle breeds: A note. *India. J. Anim. Sci.*, **42**(7): 470-471.

Nozawa K, Shatake T, Minezawa M, 1976. Blood protein variations within and between the east Asian and European horse populations, *Z.Tierzuchty Zuchtgsbiol.*, **93**: 60-74.

Nei M, 1973. Sampling variance of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76: 379-390.

Nevo E. 1984. In: Cook L M ed. Genetic and ecological diversity. London: Champan & Hall. 105-109.

Pasture N, Pasture G, Bohomme F. *et al*, 1990. Practical isozyme genetics. New York: Haslted Press. 83—150.

Sartore G C, 1969. Morris and grounder genetics. 823.

Sailion N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.*, **4**: 406-425.

Sneath P H A, Sokal R R, 1984. 数值分类学. 赵铁桥译. 北京：科学出版社. 151-153.

Takao N, Widji Widodo, 1978. Electrophoretic variations of hemoglobin and serum albumin in the Indonesian Cattle including Bali Cattle (*Bos banteng*). *Tap. J. Zootech. Sci.*, **49**(11): 817-827.

GENETIC DIVERSITY OF WENSHAN AND DIQING YELLOW CATTLE IN YUNNAN PROVINCE ASSAYED BY PROTEIN ELECTROPHORESIS

Yu Ying[①②] Wen Jikun[①] Zhu Fangxian[①] Zhao Kaidian[①]
Su Bing[②] Wang Wen[②] Zhang Yaping[②] Liu Aihua[②] Ji Weizhi[②] Shi Liming[②]

(① *Yunnan Beef Cattle and Pasture Research Center, Xiaoshao Kunming* 650212)

(② *Laboratary of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223)

Abstract

Thirty-three kinds of blood proteins and isoenzymes encoded by 37 genetic loci in Wenshan and Diqing yellow cattle from Yunnan Province were analyzed by horizontal starch gel electrophoresis, of which 6 genetic loci display polymorphic pattern. In the representive populations of Wenshan yellow cattle, the percentage of polymorphic loci(P) is 0.1389, the mean heterozygosity (H) is 0.0610. As for Diqing yellow cattle population, $P=0.1667$, $H=0.0711$. We generated Nei's genetic distance matrix for 10 cattle breeds based on our results as well as the data reported previously. The relationships among the 10 cattle breeds were analyzed by "UPGMA", "CONTML" and "NEIGHBOR" methods (PHYLIP 3.5C). Our results showed that Wenshan yellow cattle seemed to be mainly *Bos indicus* origin and Diqing yellow cattle mainly contained *Bos taurus* blood. In addition, our results also implied that Yunnan yellow cattle might be of a mixture of different populations. Some populations were domesticated by local people and the others came from outside. This resulted in a high level of genetic diversity.

Key words Yunnan yellow cattle, Protein electrophoresis, Mean heterozygosity, Genetic distance